

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Termofilik

Suhu merupakan salah satu faktor penting di lingkungan yang mengontrol aktivitas dan evolusi dari organisme hidup (Brock, 1978). Tidak semua tingkatan suhu cocok bagi pertumbuhan dan reproduksi dari organisme. Dengan demikian tinggi rendahnya suhu lingkungan sangat penting bagi organisme. Secara Umum ada 4 kelompok pembagian mikroorganisme berdasarkan suhu lingkungan tempatnya hidup yaitu mikroorganisme psikrofil, mesofil, termofil dan hipertermofil. Mikroba psikrofil dapat tumbuh pada suhu antara 0°C-30°C dengan suhu optimum 15°C. Mikroba mesofil memiliki suhu optimum antara 25°C-37°C, dengan suhu minimum 15°C, suhu maksimumnya 45°C. Mikroorganisme termofil adalah golongan mikroba yang dapat tumbuh pada suhu 40°C-75°C dengan suhu optimumnya 55°C-60°C (Hidayat, 2006).

Menurut klasifikasi fisiologis yang dibuat Gilter dijelaskan organisme termofil memiliki suhu minimum untuk hidupnya sebesar 45°C, optimum 55°C dan maksimum 70°C (Morrison, 1921). Bakteri termofil juga merupakan kelompok mikroorganisme yang dapat ditemukan di lingkungan yang sangat bervariasi kondisinya serta mampu berada pada suhu tinggi dengan sifat obligat, fakultatif maupun termotoleran (Singleton dan Amelunxen, 1973). Spesies termofil paling banyak ditemukan pada kelompok bakteri dan dapat tetap hidup pada keadaan aerob, anaerob fakultatif dan anaerob.

Bakteri termofil menghasilkan enzim termostabil yang sangat penting dalam proses industri dan bioteknologi seperti dalam teknik-teknik biologi molekuler untuk kegunaan penelitian dan diagnosa misalnya enzim yang memproses DNA dan RNA dan kemampuan enzim untuk mengubah tepung, makanan, pengolahan sampah, pembuatan kertas dan sintesis zat-zat organik (Vielle, 2001). Bakteri termofilik tumbuh optimal pada suhu 45°C-80°C, bahkan ada yang mampu hidup pada suhu 100°C atau lebih (Lestari, 2000).

Mikroorganisme termofil telah berhasil diisolasi dari berbagai sumber air panas di Indonesia antara lain sumber air panas Cimanggu, kawah Domas Tangkuban Perahu Jawa Barat (Akhmaloka, 2000). Indrajaya (2003) telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri dari sumber air panas kawah wayang dengan metode analisis gen 16S rRNA. Hasil penelitian menunjukkan homologi tertinggi ditunjukkan oleh bakteri *Geobacillus thermoleovorans* yang tumbuh pada kisaran 42°C sampai 70°C. Thomas D Brock pada tahun 1978 menemukan bakteri *Thermus aquaticus* suatu bakteri yang mampu tumbuh di atas suhu 70°C. Bakteri ini menghasilkan enzim termostabil. *Bacillus* umumnya merupakan mikroorganisme yang dominan dalam suatu lingkungan termasuk pada lingkungan yang kurang cocok membentuk endospora, sementara bakteri lain yang tidak memiliki endospora menuntut kondisi yang spesifik untuk dapat bertahan hidup.

Demikian Allah menciptakan segala sesuatu yang sesuai dengan kemampuan makhluknya seperti bakteri termofilik yang memiliki kemampuan

bertahan hidup pada kondisi suhu tinggi. Sebagaimana firman Allah dalam Al-Qur'an surat Yunus ayat 61 yaitu:

وَتَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

Artinya : kamu tidak berada dalam suatu Keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarrah (atom) di bumi ataupun di langit. tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh).

Bahreisy (1988), dalam kitab tafsir Ibnu Katsir menyatakan bahwa Allah mengetahui tentang semua makhluk-Nya pada tiap saat. Tidak ada sesuatu walau seberat zarrah atau lebih kecil dari itu yang luput dari jangkauan pengetahuanNya.

Asy-Syuyuti dalam kitab tafsir jalalain menyebutkan bahwa yang dimaksud zarrah disini adalah semut yang paling kecil. Jadi ada makhluk yang lebih kecil dari pada semut yang berada di bumi ataupun di langit melainkan semua tercatat dalam kitab yang jelas yaitu Lauh Mahfuzh. Makhluk yang lebih kecil dari semut misalnya mikroorganisme yang berukuran kecil, yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang.

Demikianlah Allah menciptakan segala sesuatu ada yang besar dan ada yang kecil dan semuanya telah diciptakan sedetail-detailnya. Dengan kemampuan yang sesuai dengan keadaanya.

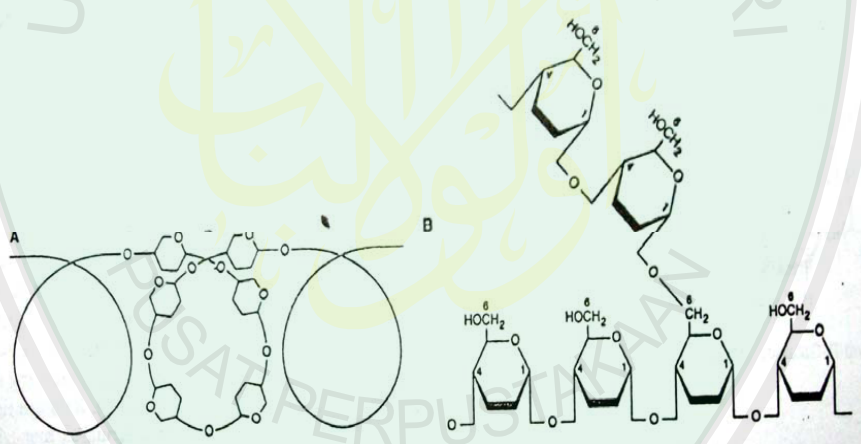
2.2 Amilum

Amilum adalah polimer karbohidrat dengan rumus molekul $(C_6H_{10}O_5)_n$. Karbohidrat golongan polisakarida ini banyak terdapat di alam, terutama pada sebagian besar tumbuhan. Amilum dalam bahasa sehari-hari disebut juga pati terdapat pada umbi, daun, batang dan biji-bijian. Amilum merupakan kelompok terbesar karbohidrat cadangan yang dimiliki oleh tumbuhan sesudah selulosa (Liu, 2005). Butiran-butiran pati apabila diamati dengan mikroskop ternyata berbeda-beda bentuknya dan ukurannya tergantung dari tumbuhan apa pati tersebut diperoleh (Poedjiadi, 1994). Amilum merupakan bagian dari homopolisakarida yang monomer monosakaridanya ialah D-4-glukosa dengan sub monomer maltosa. Pada umumnya amilum secara mikroskopis berbentuk butiran yang berbeda-beda sesuai dengan asal mula pati tersebut (Hawab, 2004).

Secara kimia hidrolisis pati terjadi pada pemanasan dengan asam encer yang secara berturut-turut terbentuk amilodekstrin. Amilodekstrin memberi warna biru dengan penambahan iodin, sedangkan akrodekstrin, maltosa, dan glukosa tidak memberi warna dengan penambahan iodium. Secara enzimatik hidrolisis dikatalis oleh kelompok enzim amilase (Poedjiadi, 1994).

Pati dapat dipisahkan menjadi dua fraksi utama berdasarkan kelarutan bila di larutkan ke dalam air panas: 20% larut dalam air yang disebut amilosa dan 80% sisanya merupakan amilopektin yang memiliki sifat tidak larut dalam air (Pudjaatmaka, 1982). Amilosa merupakan rantai hidrokarbon yang lurus dengan satu ujung bersifat pereduksi dan ujung lain nonpereduksi. Berat molekul amilosa beberapa ribu dan lebih ringan dari pada amilopektin serta tidak larut dalam air

(Hawab, 2004). Amilopektin merupakan rantai molekul polisakarida yang memiliki banyak percabangan. Molekul D-glukopiranososa yang menjadi unit monomernya yang berikatan lewat ikatan α -1,4 glikosida seperti pada amilosa yang membentuk rantai lurus dan ikatan α -1,6 glikosida yang membentuk percabangan pada rantai amilopektin tersebut (Murray, 2003). Molekul amilosa merupakan molekul yang tidak larut dalam air dan memberikan warna biru apabila tercampur dengan larutan iodin, sedang amilopektin merupakan molekul yang larut dalam air dan akan kelihatan berwarna merah bila terkena iodin (Stanley, 1988). Struktur amilum dan amilopektin dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Hawab, 2004).



Gambar 2. 1. A. Amilosa dengan struktur gulungan heliks
B. Amilopektin dengan titik cabang 1-6

Butir-butir pati tidak larut dalam air dingin, tetapi apabila suspensi dalam air dipanaskan terbentuk suatu larutan koloid yang kental. Bila pati dipanaskan dan didilusi dengan asam, pati akan terhidrolisis menjadi dekstrin, maltosa dan D-glukosa (Sale, 1961). Semua hasil hidrolisis ini memiliki sifat yang larut dalam air. Hidrolisis dari pati juga dapat terjadi dengan bantuan enzim amilase yang

akan mengubah amilum menjadi maltosa dalam bentuk β -maltosa (Poedjiadi, 1994).

Dalam kehidupan manusia amilum berperan sebagai sumber makanan penghasil energi utama dari golongan karbohidrat, disamping itu amilum juga dapat berperan sebagai bahan aditif pada proses pengolahan makanan, misalnya sebagai penstabil dalam proses pembuatan puding. Amilum juga berperan dalam pembuatan sirup dan pemanis buatan seperti sakarin. Dalam bidang non makanan, amilum digunakan untuk bahan baku dalam proses pembuatan kertas, pakaian dari katun, industri cat, maupun untuk produksi hidrogen (Van der Mareel, 2002).

Industri makanan dalam pembuatan roti juga menggunakan enzim amilase untuk mendapatkan kualitas roti yang optimal. Tepung terigu yang sudah mengandung β -amilase ditambah dengan α -amilase akan mengintensifkan amilolisa yang akan menjamin kualitas roti. Roti yang dibuat dengan penambahan α -amilase akan tetap segar untuk kurun waktu yang lebih lama, karena dekstrin terakumulasi dalam inti dan gelatinization yang lebih baik dari pati yang tidak terhidrolisis. Jumlah dekstrin yang lebih banyak dengan berat molekul rendah sangat efektif dalam penurunan kekerasan roti, sehingga menghasilkan perbaikan dalam volum dan tekstur produk dan roti yang diperoleh juga memiliki volume yang lebih besar, rasa lebih jelas dan kesegaran lebih lama (Silaban, 2014).

Industri tekstil, enzim α -amilase digunakan untuk membantu dalam proses penghilangan pati yang digunakan sebagai perekat untuk melindungi benang saat di tenun agar lentur. Proses ini memerlukan suhu tinggi sekitar 70°C-80°C, sehingga digunakan enzim yang bersifat termostabil yang tahan terhadap suhu

tinggi karena suhu yang tinggi dapat meningkatkan laju reaksi kimia termasuk reaksi enzimatik serta dapat mengurangi kontaminasi (Setiasih, 2006).

2.3 Enzim

Enzim merupakan protein khusus yang dapat bergabung dengan suatu substrat spesifik untuk mengkatalis reaksi biokimia dari substrat tersebut (Maier, 2000). Dalam reaksi tersebut enzim mengubah senyawa yang disebut substrat menjadi bentuk suatu senyawa baru yang disebut produk. Enzim memiliki substrat spesifik dan reaksi kimia yang spesifik untuk dikatalisnya (Palmer, 1985). Aktivitas enzim dipengaruhi oleh suhu, pH dari lingkungan tempat enzim bekerja, konsentrasi substrat, aktivator dan inhibitor enzim.

Suhu berpengaruh besar terhadap aktivitas enzim. Semua enzim bekerja dalam rentang suhu tertentu pada tiap jenis organisme. Peningkatan suhu eksternal secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim yaitu kerusakan struktur protein enzim, terutama kerusakan pada ikatan ion dan ikatan hidrogennya. Hal ini menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi yang dikatalis oleh enzim tersebut. Denaturasi enzim di atas suhu optimum akan menyebabkan terjadinya kematian sel organisme, tetapi beberapa organisme mampu bertahan hidup dan tetap aktif pada suhu yang sangat tinggi, dimana organisme lain sudah tidak mampu lagi hidup seperti bakteri dan alga yang di temukan pada sumber-sumber air panas di Taman nasional Yellow Stone Amerika, suhu optimum untuk hidupnya sebesar 70°C (Brock, 1978).

Selain suhu aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH lingkungan tempat enzim tersebut bekerja. Banyak enzim yang sensitif terhadap perubahan pH dan setiap enzim memiliki pH optimum untuk aktivitasnya. Perubahan pH dapat menyebabkan berhentinya aktivitas enzim akibat proses denaturasi pada struktur tiga dimensi enzim. Umumnya enzim bekerja optimum pada rentang pH 6-8, tetapi beberapa jenis organisme dapat hidup pada pH yang lebih rendah yang dikenal dengan istilah asidofil ataupun pada pH yang lebih tinggi yang dikenal dengan istilah alkalifil (Palmer, 1985). Menurut Pelczar (1986), pH optimum pertumbuhan bagi kebanyakan bakteri terletak antara 6,5 dan 7,5. Namun, beberapa spesies dapat tumbuh dalam keadaan sangat masam atau sangat alkalin. Bagi kebanyakan spesies, nilai pH minimum dan maksimum ialah antara 4 dan 9.

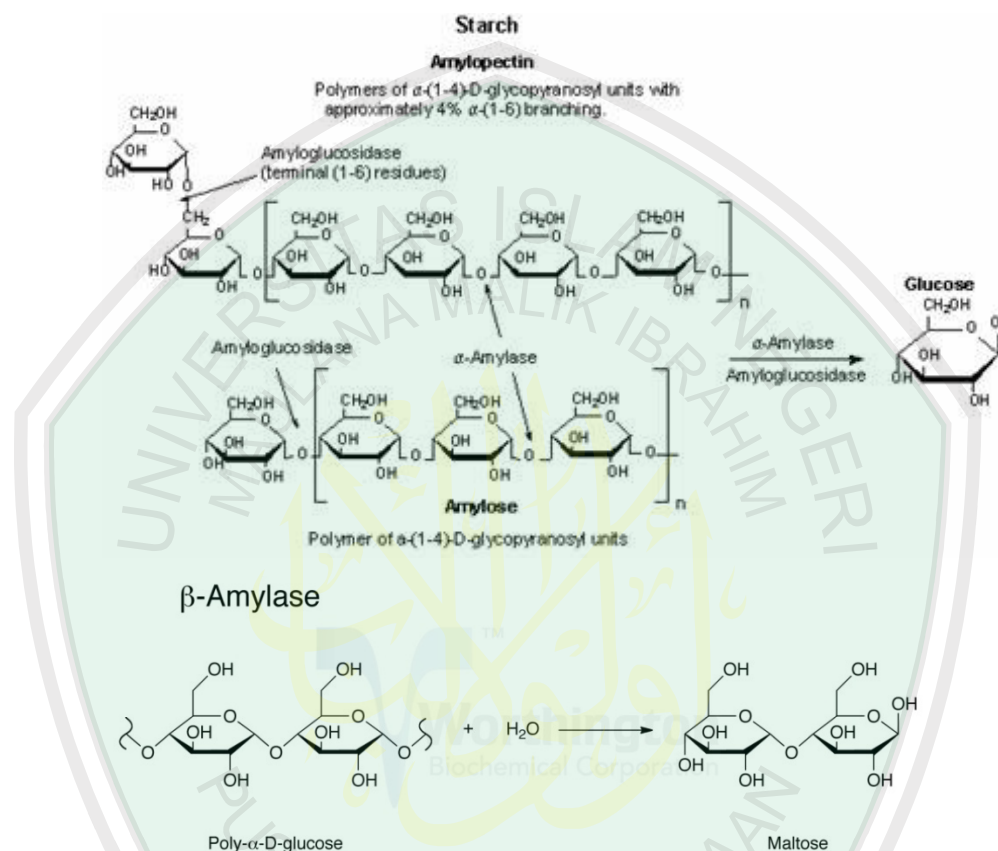
Aktivitas enzim di lingkungan juga terjadi pada berbagai sumber mikroorganisme seperti bakteri, jamur dan aktinomisetes. Mikroorganisme ini menghasilkan enzim intraseluler dan enzim ekstraseluler. Enzim intraseluler merupakan enzim yang langsung digunakan di dalam sel, dan sering ditemukan pada bagian membran dari sebuah organel sel. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang dilepas dari sel ke lingkungan untuk menghidrolisis molekul polimer di lingkungan, seperti selulosa, hemiselulosa, lignin, ataupun juga untuk memfasilitasi pengambilan suatu zat dari lingkungan bagi kebutuhan metabolismenya (Maier, dkk., 2000). Enzim ekstraseluler dapat dipisahkan dari lingkungan dengan filtrasi ataupun sentrifugasi, sedangkan enzim intraseluler dapat diekstrak dari dalam sel lewat proses pemecahan sel (Palmer, 1985).

2.4 Enzim Amilase

Amilase adalah kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada molekul amilum. Hasil hidrolisis atau pemecahan molekul amilum ini adalah molekul-molekul yang kecil seperti maltose, dekstrin dan terutama molekul glukosa sebagai unit terkecil (Reddy, 2003). Amilase dihasilkan oleh berbagai jenis organisme hidup, mulai dari tumbuhan, hewan, manusia bahkan pada mikroorganisme seperti bakteri dan fungi. Kelompok enzim ini memiliki banyak variasi dalam aktivitasnya, sangat spesifik, tergantung pada sumber organismenya dan tempat bekerja. Enzim amilase memiliki nama asli diastase dan pertama kali ditemukan dan diisolasi Anselme Payen pada tahun 1833.

Seiring dengan penemuan-penemuan baru di bidang penelitian kelompok enzim amilase yang dapat mendegradasi amilum dan senyawa polisakarida lainnya juga semakin bertambah jumlahnya. Beberapa kelompok enzim amilase tersebut yaitu α -amilase, β -amilase dan γ -amilase (Martoharsono, 2006). α -Amilase bekerja memutus ikatan α -1,4 glikosida pada amilum secara acak terutama pada rantai panjang, sehingga menghasilkan maltotriosa dan maltosa dari polimer amilosa pada amilum dan menghasilkan glukosa dan sedikit dekstrin dari polimer amilopektin pada amilum. β -Amilase bekerja menghidrolisis amilum dari bagian ujung non reduksi dan menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosida pada tahap kedua hidrolisis amilum sehingga terbentuk molekul maltosa yang di susun oleh dua unit glukosa pada saat yang sama setelah α -amilase bekerja. γ -Amilase atau disebut glucan 1,4- α -glukosidase bekerja memutus ikatan glikosida pada

bagian ujung non reduksi dari amilosa dan amilopektin untuk menghasilkan unit glukosa (Aiyer dan Hagihara dalam Christina, 2008). Berikut ini jenis reaksi hidrolisis yang dikatalis oleh enzim amilase (Susilawati, 2009) :



Gambar 2. 2. Reaksi Hidrolisis Pati yang Dikatalis Oleh Enzim Amilase

Penggunaan enzim amilase dalam industri sangat luas mulai dari industri pembuatan roti, sirup, pemanis, campuran oligosakarida, dekstrin, industri tekstil, pembuatan ethanol, pengujian limbah cair yang mengandung amilum, industri detergen, industri obat dan suplemen enzim (Palmer, 1985). Karena enzim ini sangat bernilai komersil maka perlu ditemukan banyak sumber-sumber penghasil enzim amilase dengan karakteristik yang sesuai dengan yang dibutuhkan. Enzim

yang dapat menghidrolisis pati serta mikroorganisme yang menghasilkan enzim dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Table 2.1 Enzim Termostabil Yang Menghidrolisis Pati Dan Mikroorganisme Sebagai Sumbernya (Underkofler, 1976)

Enzim	Mikroorganisme	Suhu optimal (°C)	pH optimal
α -amilase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70	7,0
	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	6,0-6,5
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70-80	5,0-6,0
	<i>Bacillus subtilis</i>	70	7,0
	<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	55	5,5
	<i>Myceliophthora thermophila</i>	100	5,6
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	5,5
	<i>Pyrococcus woesei</i>	100	6,5-7,5
	<i>Staphylothermus marinus</i>	65	5,0
	<i>Thermococcus aggregans</i>	100	5,5
	<i>Thermococcus celer</i>	90	4,0-6,3
	<i>Thermococcus fumicolans</i>	95	4,8-7,8
	<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	85	4,0-5,0
	<i>Thermococcus profundus</i>	80	-
β -amilase	<i>Bacillus circulans</i>	60	-
	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	50	7,5
	<i>Bacillus</i> sp.	50	5,5
	<i>Clostridium thermosulphurogenes</i>	75	-

2.5 Amilase dari Mikroorganisme

Enzim yang digunakan untuk keperluan industri sebagian besar diisolasi dari mikroba. Pemilihan mikroba sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan enzim yang diisolasi dari tumbuhan maupun hewan. Keuntungan itu antara lain sel mikroba lebih mudah untuk ditumbuhkan dan kecepatannya relative lebih cepat, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan apabila dikehendaki produksi yang lebih besar, biaya produksinya relatif lebih murah, kondisi selama produksi tidak tergantung oleh adanya

perubahan musim dan waktu yang dibutuhkan dalam proses produksi lebih singkat (Poernomo, 2003).

Enzim α -amilase yang dihasilkan oleh bakteri banyak dimanfaatkan dalam industri, terutama industri makanan, minuman, tekstil, farmasi dan detergen. Hal ini karena umumnya amilase asal bakteri mempunyai aktivitas yang tinggi dan bersifat termostabil dibandingkan yang berasal dari fungi dan hewan. Sebagian besar industri, seperti industri makanan dan minuman menggunakan α -amilase dari bakteri yang tahan terhadap asam (Corderio, dkk., 2002). Namun lain halnya dalam industri detergen, tekstil, dan farmasi yang justru menggunakan amilase basa atau alkali (Hagihara, dkk., 2001).

Amilase secara umum diproduksi oleh tumbuhan, hewan, manusia dan mikroba, tetapi enzim amilase yang berasal dari fungi dan bakteri mendominasi penggunaan enzim amilase di bidang industri. Beberapa jenis *Bacillus sp.* dan *Actinomyces* termasuk *Thermomonospora* dan *Thermoactinomyces* merupakan kelompok yang memiliki kemampuan besar dalam memproduksi enzim amilase, *Bacillus licheniformis* memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim amilase dalam kondisi lingkungan yang bersifat alkalis (Reddy, 2003).

Enzim amilase yang dihasilkan oleh mikroba terutama dari bakteri, merupakan jenis enzim ekstraseluler (Palmer, 1985). Bakteri menghasilkan enzim ini di dalam sel dan menggunakan diluar sel, yaitu untuk menghidrolisis sumber makanan yang mengandung amilum yang terdapat di lingkungan. Molekul amilum tidak dapat masuk kedalam sel bakteri karena ukurannya sangat besar, karena itu molekul amilum dihidrolisis terlebih dahulu oleh enzim amilase

ekstraseluler menjadi molekul karbohidrat yang lebih sederhana dan kecil ukuran molekulnya. Molekul hasil hidrolisis amilum oleh enzim amilase tersebut selanjutnya akan di transport masuk kedalam sel bakteri dan didukung sebagai sumber karbon bagi aktifitas pertumbuhan dan kehidupannya (Benson, 1994).

Bakteri termofilik yang dapat menghasilkan enzim amilase telah banyak di isolasi dari berbagai sumber air panas di Indonesia. Salah satunya yaitu hasil isolasi bakteri amilolitik dari sumber air panas Rimbo Panti dan Kili-kili dengan jumlah 12 koloni bakteri yang bersifat amilolitik, yakni dengan terbentuknya zona bening antara 1,0 sampai 3,6 cm disekitar koloni bakteri. Isolate tersebut mempunyai pH optimum 5, 6 dan 7. Tetapi pada pH 8 enzim memiliki aktivitas yang sangat kecil (Agustien, 2013).

Bakteri termofilik yang menghasilkan enzim termostabil seperti enzim amilase sering dimanfaatkan dalam bidang industri tekstil, hidrolisis pati, bir, sirup dan pembuatan detergen karena dapat menghemat biaya. Enzim ini memiliki waktu simpan yang lebih lama dan aktifitas yang lebih tinggi pada suhu tinggi. Dengan aktivitas yang tinggi (produktivitas juga tinggi) keuntungan yang diperoleh juga tinggi karena alokasi dana untuk investasi dapat diperkecil (Lestari, 2000).

Enzim amilase ekstraseluler yang dihasilkan bakteri maupun fungi tersebut dimanfaatkan sebagai katalisator dalam industri maupun untuk keperluan dalam bidang kesehatan. Untuk mendapatkan enzim amilase dari mikroba tersebut disentrifugasi untuk mendapatkan supernatan yang mengandung enzim amilase ekstraseluler (Palmer, 1985).

2.6 Identifikasi Spesies Bakteri Menggunakan *Microbact* (Oxoid)

Salah satu cara identifikasi mikroorganisme yaitu dengan menganalisa kemampuan metabolismenya dengan menggunakan suatu metode uji biokimia. Uji biokimia yaitu meliputi kemampuan mikroorganisme dalam menggunakan berbagai jenis sumber karbon dan senyawa kimia lainnya. Uji biokimia yang beragam dan semakin banyak jenis senyawa pengujian maka akan diperoleh hasil identifikasi yang spesifik hingga tingkat spesies (Buckle, dkk, 1987).

Kit *Microbact* 12E dan *Microbact* 12B adalah alat identifikasi sistem komersial untuk bakteri secara umum dan bakteri Gram negatif dan Gram positif golongan enterobacter. *Microbact* 12E untuk bakteri Gram negatif dan *Microbact* 12B untuk bakteri Gram positif. Tes ini terdiri dari substrat sebanyak 12 biokimia yang berbeda tes ditempatkan di sumur *microbact*. Pengujian dengan menggunakan *Microbact* akan semakin mempermudah metode pengidentifikasian suatu mikroorganisme. *Microbact* mempunyai sistem yang dirancang untuk mengidentifikasi bakteri dengan komposisi substrat dan pereaksi yang telah distandarisasi. Pengujian dengan *Microbact* memiliki beberapa ketentuan sebelum dilakukan pengujian, yaitu sampel isolat yang digunakan merupakan isolat yang telah dimurnikan dan dilarutkan ke dalam garam fisiologis (Oxoid, 2004).

Prinsip kerja dari *Microbact* yaitu dengan mereaksikan suspensi isolat ke dalam sumur-sumur yang telah berisi sumber karbon dan senyawa-senyawa biokimia lain yang berjumlah 12 jenis. Suspensi bakteri yang dilarutkan ke dalam garam fisiologis ditambahkan ke masing-masing 12 sumur uji biokimia yang tersedia. Setelah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C reagen yang sesuai

ditambahkan dan perubahan warna tes pada tiap sumur yang berbeda dicatat. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*. Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*). Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat (Oxoid, 2004).

2.7 Penentuan Aktivitas Enzim Amilase dengan Metode DNS

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai suatu jumlah enzim yang dapat menyebabkan perubahan atau transformasi substrat sebanyak 1 mikromol per menit pada suhu dan lingkungan optimal selama pengukuran aktivitas berlangsung. Aktivitas enzim amilase dihitung berdasarkan data kadar glukosa relatif sebagai mg glukosa yang dihasilkan oleh 1 mL filtrat kasar amilase. Satu Unit aktifitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya μmol glukosa yang dihasilkan dari hidrolisa media pati oleh 1 mL ekstrak kasar enzim amilase selama masa inkubasi (Lehninger, 1993).

Metode kuantitatif yang dapat digunakan dalam uji aktivitas amilase adalah dengan mengamati kadar gula tereduksi yang dihasilkan oleh hidrolisis enzim terhadap substrat. Dari berbagai cara uji aktivitas amilase yang paling sering digunakan dalam penelitian adalah dengan menggunakan metode dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) atau Somogy-Nelson (Somogy, 1952).

Komponen pereaksi DNS adalah asam dinitrosalisilat, garam *rochelle* (KNa-Tartrat), fenol, sodium bisulfit, dan natrium hidroksida. Komponen-

komponen tersebut memiliki fungsi, yaitu asam 3,5-dinitrosalisilat untuk mereduksi glukosa dalam keadaan basa yang dibantu oleh natrium hidroksida, garam *rochelle* untuk menghilangkan pengaruh senyawa yang mengganggu sehingga kompleks warna tetap stabil, fenol berfungsi untuk stabilisasi warna yang terbentuk, dan sodium bisulfit untuk menghilangkan pengaruh oksigen terlarut yang dapat mengoksidasi glukosa produk (Miller, 1959).

2.8 Sumber Air Panas Pacet Mojokerto

Perwujudan panas bumi di permukaan adalah sebagai indikasi adanya aktifitas panas di dalam bumi. Bentuk perwujudan aktifitas panas bumi di dalam perut bumi tersebut dapat berupa munculnya mata air panas, munculnya bualan gas ke permukaan tanah, fumarola, solfatara dan tanah panas. Mata air panas yang muncul ke permukaan dapat mengandung klorida, bikarbonat ataupun sulfat (Cristina, 2008).

Meskipun sumber air panas memiliki suhu tinggi ternyata dapat di gunakan sebagai tempat hidup bagi beberapa mikroorganisme seperti bakteri yang bersifat termofil. Sumber air panas selain memiliki air yang suhunya cukup tinggi juga memiliki suatu aroma khas yaitu berupa aroma hydrogen peroksida (H_2S) yang berasal dari aktifitas bakteri anaerob yang menggunakan senyawa-senyawa sulfur (Cristina, 2008).

Sumber mata air panas Ubalan Pacet terletak di kawasan wisata Ubalan di daerah pegunungan di Desa Padusan Kecamatan Pacet Kabupaten Mojokerto Propinsi Jawa Timur Indonesia. Kawasan ini berada pada ketinggian 800 mdpl di bawah kaki gunung Welirang, suhu rata-rata $20^{\circ}C$ dengan curah hujan rata-rata

3.000mm/tahun. Jarak dari Kabupaten Mojokerto sejauh 30 km dan kota Batu 29 km. Lokasi ini tepatnya terletak pada $7^{\circ},41',8.0''$ LS dan $112^{\circ},32',52.35''$ LT. Sumber air panas disini memiliki suhu air $40^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$ dan pH netral.

